

УДК 576.893.19+593.19

# НОВЫЕ ТАКСОНЫ В ТИПЕ SPOROZOA, SPIROMONADOMORPHINA SUBCL. N. SPIROMONADIDA ORDO N.

М. В. Крылов, А. П. Мыльников

Исследована ультраструктура бесцветного хищного жгутиконосца *Spiromonas angusta*. План строения *S. angusta* полностью соответствует плану строения споровиков. На основании оригинальных и литературных данных представители сем. Spiromonadidae Hollande, 1952 выделяются в подкласс Spiromonadomorphina subcl. n. с отрядом Spiromonadida ordo n. в классе Perkinsemorpha Levine, 1978, типе Sporozoa.

Биология и морфология хищного бесцветного жгутиконосца *Spiromonas angusta* подробно описаны на световом уровне Алексеевым (Alexeieff, 1929). Этот вид весьма обычен в очистных сооружениях, реже встречается в открытых водоемах, в основном в составе бентоса (Жуков, Мыльников, 1983). Представители рода *Spiromonas* характеризуются облигатным хищничеством. Было показано (Мыльников, 1983), что *S. angusta* питается многими видами жгутиконосцев: *Bodo caudatus*, *B. saltans*, *B. curvifilus*, *Pleuromonas jaculans*, *Rhynchomonas nasuta*, *Ochromonas* spp., *Anthophysa vegetans*. Хищник высасывает жертву через передний клювовидный конец тела. Жизненный цикл *S. angusta* включает в себя стадию копуляции, цистообразования и последующего формирования в цисте 2, 3 или 4 особей (Alexeieff, 1929).

Спиромонасы ранее были выделены в отдельное сем. Spiromonadidae Hollande, 1952 в отряде Bodonida. Однако последующие исследования показали, что у всех видов рода *Spiromonas* отсутствует кинетопласт, что делает невозможным включение их в отряд Bodonida. В настоящее время существует три точки зрения на положение спиромонасов в системе. Бружероль и Миньо (Brugerolle, Mignot, 1979) сближают их с паразитическими динофлагеллатами, Крылов и Добровольский (1980) считают, что спиромонасы имеют филогенетические связи с Sporozoa, Фойснеры (Foissner, Foissner, 1984) полагают, что спиромонасы должны быть отнесены к зоофлагеллатам.

В настоящей работе предпринята попытка на основе оригинальных материалов по ультраструктуре *S. angusta* и анализа имеющихся в литературе данных по морфофункциональной организации *S. perforans* и *S. gonderi* приблизиться к решению вопроса о природе спиромонасов и их положении в системе.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

*Spiromonas angusta* выделен из очистных сооружений пос. Борок Ярославской обл. и клонирован. Жгутиконосцев культивировали в чашках Петри, наполненных средой Пратта. Пищей служила суспензия бактериотрофных жгутиконосцев *Parabodo nitrophilus*, которых размножали в среде с добавлением бактерий *Aerobacter aerogenes*. Время удвоения численности хищника составило 2—10 ч при 20—22 °С. Максимальная численность особей (30—60 тыс. экз./мл) в культуре регистрировалась на 5—8-е сутки после инокуляции.

Живые организмы исследовались под микроскопом Peraval фирмы «Zeiss», снабженным интерференционной оптикой. Для электронно-микроскопического

изучения взвесь жгутиконосцев концентрировали центрифугированием. Осевших на дно пробирки особей фиксировали смесью 2 %-ного  $\text{OsO}_4$  и 0.6 %-ного глутаральдегида на 0.05 М какодилатном буфере в течение 15—45 мин при 1 °С. После дегидратации в серии спиртов и безводного ацетона препараты помещали в смесь Эпона 812 и Аралдита М. Срезы окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу и просматривали в микроскопе JEM-100С при 60 кв.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследования в световом микроскопе (рис. 1) показали, что морфологически штамм *Spiromonas angusta* соответствует описанию этого вида Алексеевым (Alexeeff, 1929). Общий план строения и основные органеллы показаны на рис. 2; 3, 5 (см. вкл.).

В культуре *S. angusta* активно плавает около дна или на поверхностной пленке воды, совершая быстрые маятникообразные движения. После контакта переднего конца тела хищника с жертвой первый замирает и в течение 5—15 мин полностью или частично высасывает жертву (рис. 3, 1). При микроскопировании

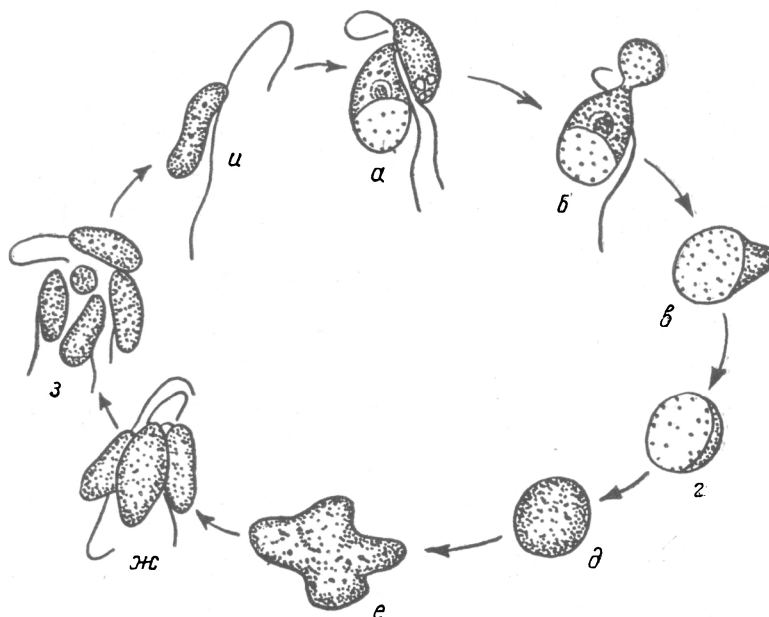


Рис. 1. Жизненный цикл *Spiromonas angusta*.

а, б — поедание жертвы; в—д — образование цисты; е—з — деление цисты на четыре особи; и — молодая особь.

в поляризованном свете хорошо заметен процесс перемещения цитоплазмы жертвы в тело спироноаса. Парализующего действия спироноаса на жертву не обнаружено. Одну жертву иногда высасывают одновременно два спироноаса. В этом случае процесс питания может быть спутан с начальными стадиями копуляции. После поглощения нескольких жертв спироноас округляется, теряет подвижность, оседает на дно, где инцистирует (рис. 3, 2). Через 30—40 мин в цисте формируются 2, 4 чаще 3 дочерние особи (рис. 3, 3, 4). После разрыва оболочки молодые особи уплывают. Небольшое округлое тельце на месте инцистирования, вероятно, представляет собой остатки пищи. Дочерние особи в отличие от материнской имеют удлиненную форму тела. Сразу после выхода из цисты особи начинают питаться. После выедания всех *P. nitrophilus* спироноасы погибают.

Форма тела спироноаса яйцевидная или каплевидная, с заостренным передним концом тела. Длина клеток обычно составляет 8—10 мкм, иногда достигает 18 мкм, ширина чаще варьирует от 3 до 4 мкм, реже до 10 мкм. Диаметр цисты колеблется от 7 до 8 мкм. Передний жгутик незначительно превышает длину

тела, задний жгутик вдвое длиннее тела. Ядро обычно располагается в центре, а пищеварительная вакуоль в задней части тела спиромонаса.

Снаружи клетка покрыта плазмалеммой. Сразу под ней располагаются две мембраны, которые представляют собой дериваты эндоплазматического ретикулюма (рис. 4, 1, 2; см. вкл.). Таким образом, пелликула спиромонаса состоит из трех мембран общей толщиной 28—30 нм. Плазмалемма покрывает всю поверхность клетки, субпелликулярный мембранный комплекс в жгутиковом кармане и на переднем конце тела отсутствует (рис. 3, 8; 4, 6). Стенки микропор сформированы инвагинацией пелликулы (рис. 4, 2, 3). Диаметр микропор составляет 30 нм, глубина 50 нм. Наибольшая толщина стенок микропоры равна 30 нм. Одна микропора всегда локализуется в стенке жгутикового кармана, а другие эпизодически обнаруживаются на переднем конце тела (рис. 4, 6, 9).

Под пелликулой лежат 25—27 субпелликулярных микротрубочек, проходящих спереди назад от переднего конца клетки к заднему (рис. 3, 6, 7; 4, 4). Расстояние между микротрубочками составляет 77—115 нм.

Жгутики не несут мастиго-нем. Аксонема жгутиков устроена по формуле 9+2. Проксимальная часть переднего жгутика незначительно утолщена (рис. 4, 6). Параксиального стержня в жгутиках, как и у бодонид, не обнару-

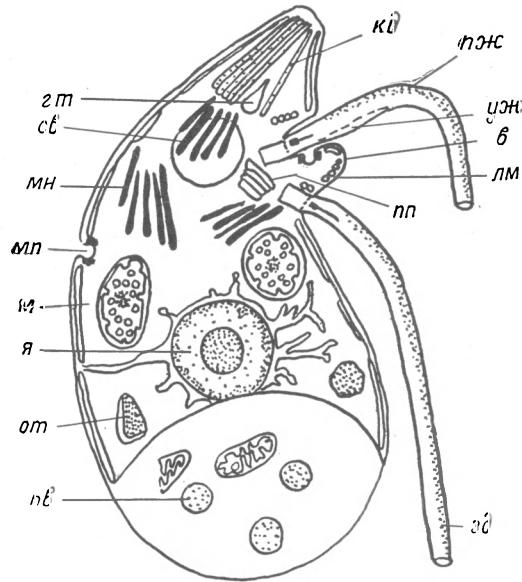


Рис. 2. Схема строения *Spiromonas angusta*.

в — валик между жгутиками, зж — грушевидное тело, зд — задний жгутик, кд — коноид, лм — лента микротрубочек, м — митохондрия, мн — микронемы, мп — микропора, от — осmioфильные тела, пж — пищеварительная вакуоль, пж — передний жгутик, пп — полосатая пластинка, св — сократительная вакуоль, уж — утолщение жгутика, я — ядро.

жено. Передний жгутик выходит из жгутикового кармана (рис. 4, 4, 6, 9), глубина которого варьирует от 0.23 до 0.34 мкм. Основания жгутиков разделены небольшим валиком (рис. 4, 4, 8). Две центральные фибриллы аксонемы оканчиваются на расстоянии 80 нм от поперечной пластинки (рис. 4, 4, 5). Поперечная пластинка представлена двумя вложенными друг в друга кольцами (рис. 4, 7). Кинетосома одного из жгутиков возвышается над другой на 0.5 мкм (рис. 4, 4). Оси кинетосом располагаются под прямым или реже острым углом друг к другу (рис. 4, 4, 9). Соединительного мостика между кинетосомами не обнаружено. От кинетосомы переднего жгутика отходит аморфная треугольная пластинка длиной 0.5—0.6 мкм (рис. 4, 5, 8). На поперечных срезах заметно, что она состоит из 4 светлых и 5 темных продольных полосок. Корешки с неясными очертаниями отходят от обеих кинетосом (рис. 4, 6). Систему субпелликулярных микротрубочек дополняют две ленты из четырех микротрубочек, проходящих вблизи кинетосом, и лента из двух микротрубочек, лежащая около переднего жгутика (рис. 4, 5, 6, 9). Одна из четырех трубчатых лент тянется вдоль пелликулы.

На острие переднего конца тела начинается своеобразная лента из 24—25 микротрубочек, представляющих собой коноид (рис. 3, 5, 8; 4, 4). Каждая микротрубочка окружена небольшим количеством осmioфильного материала. Диаметр переднего конца коноида составляет 350 нм, заднего — 480 нм. Длина коноида равна 1.5 мкм. Форма коноида напоминает конус. Передний его конец замкнут в кольцо, задний расширен в дугу. Открывающаяся щель повернута к жгутикам. В клетке лежат три пучка электронноплотных узких образований, похожих на микронемы споровиков. Длина их составляет 1 мкм, диаметр

20—30 нм. Конец микронем, обращенный к передней части клетки, обычно сужен. Единичная микронема имеет темную сердцевину. Один пучок микронем проходит внутри коноида, второй лежит рядом с коноидом, третий соединен с корешками кинетосом. Каждый пучок может содержать до 52—56 микронем (рис. 4, 10). Внутри коноида заметны грушевидные осмиофильные тела (размером  $0.1 \times 0.5$  мкм), похожие на роптрии, но меньшего размера.

Пузырьковидное ядро (диаметром 1.7—2.2 мкм) располагается обычно посередине тела (рис. 3, 5). Ядерные поры малозаметны. Ядрышко (диаметром 0.8—1.0 мкм) лежит обычно в центре ядра. Глыбки хроматина находятся по периферии ядра. Внешняя оболочка ядра образует разветвления в цитоплазме. Иногда она соединяется с двумя мембранами пелликулы.

Аппарата Гольджи выявить не удалось. Цитоплазма спиромонасы густо наполнена рибосомами. Митохондрии диаметром 0.5—3.0 мкм с трубчатыми кристами имеют овальную или удлинненную форму (рис. 3, 5). Иногда митохондрии принимают кольцевидную форму. В центральной части митохондрий отмечены осмиофильные структуры. Сократительная вакуоль располагается вблизи кинетосом.

В середине тела и в заднем его конце находятся два типа осмиофильных образований, не ограниченных мембраной. К первому типу относятся округлые образования (диаметром 350—450 нм) с неровными стенками и гомогенным содержанием. Вторым типом — это обычно треугольные, реже четырехугольные тела со светлой каймой (рис. 4, 7).

Единственная пищеварительная вакуоль содержит остатки жертвы: фрагменты митохондрий, жгутиков, кинетопласта. Эта вакуоль занимает до 1/3 объема клетки. Цитостома не обнаружена.

Циста покрыта тонкой оболочкой (толщиной 10—15 нм). Внутри нее обнаружены кинетосомы и (предположительно) аксонемы жгутиков. Ядро располагается около центра. В цисте появляется много осмиофильных тел. В цисте митохондрии чаще имеют продолговатую или кольцевидную форму, достигая при этом 4.5 мкм длины и 0.5 мкм толщины. В центре цисты располагается пищеварительная вакуоль. В некоторых делящихся цистах заметны четыре ядра.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Жгутиконосец *S. angusta* один из трех известных в настоящее время видов рода *Spiromonas*. Как показало наше исследование, план строения *S. angusta* в основном сходен с таковым у *S. perforans* (Brugerolle, Mignot, 1979) и *S. gonderi* (Foissner, Foissner, 1984). Такими сходными структурами являются трехслойная пелликула, взаимное расположение кинетосом и жгутиков, митохондрии с трубчатыми кристами, ленты микротрубочек, субпелликулярная система микротрубочек, микронемы и микропоры. Все три вида ведут хищнический образ жизни. Они нападают на добычу, высасывая содержимое жертвы через передний конец своего тела. Следовательно, филогенетическая общность этих видов не вызывает сомнений. Однако между ними имеется ряд различий, которые проявляются как в специфичности жертвы, так и в ультраструктуре отдельных органелл. *S. gonderi* нападает на инфузорий *Colpoda*, *S. perforans* высасывает фитофлагеллат *Chilomonas paramecium*, тогда как *S. angusta* поедает мелких жгутиконосцев. Коноид у *S. gonderi* состоит из 4—5 микротрубочек, а у *S. angusta* из 24—25 микротрубочек, у *S. perforans* четко сформированного коноида не найдено. Стрекательные органеллы (трихоцисты) известны только у *S. perforans*. У *S. angusta* от кинетосом жгутиков отходит треугольная пластинка. Она по своей структуре сходна с межкинетосомальным мостиком у *S. gonderi*. Крупные микронемы найдены у *S. perforans*, более тонкие у *S. gonderi* и *S. angusta*. Причем у последнего микронемы собраны в три пучка. Осмиофильные тела у *S. angusta* в определенной степени сходны с запасными веществами других спиромонасов. Обращает на себя внимание отсутствие у *S. angusta* аппарата Гольджи.

Здесь необходимо отметить, что имеется одна работа (MacDonald, Darbyshire, 1977), в которой у *Spiromonas angusta* якобы обнаружены пластинчатые кристы в митохондриях. По-видимому, авторы допустили диагностическую ошибку и

имели дело не со спиромонасом, а с организмом, относящимся к кинетопластидам или криптомонадам. Эту же мысль высказывает Бружероль и Миньо (Brugerolle, Mignot, 1979).

Обращает на себя внимание большое сходство тонкой структуры *S. angusta* и других видов этого рода с зооспорами паразита устриц *Dermocystidium marinum* (Perkins, 1976). Последний характеризуется коноидом из 17—20 микро-трубочек, полярным кольцом, от которого отходят 39 субпелликулярных микро-трубочек, микропорами, роптриями, микронемами и двумя жгутиками. План строения этих организмов в общем совпадает. Тем самым проясняется таксономическое положение спиромонасов в системе простейших.

Помещение Холандом спиромонасов в отряд Bodonidae (Hollande, 1952) (ныне это подотряд в отряде Kinetoplastida) представляется сейчас проблематичным. У бодонид и спиромонасов различный план строения. Бодониды характеризуются кинетопластом, пластинчатыми кристами в митохондриях, параксиальным стержнем в жгутиках, цитофаринксом. У них нет ничего похожего на апикальный комплекс.

Единственная сходная со спиромонасом группа простейших — это споровики. Эти паразитические простейшие имеют следующий план строения: трехслойная пелликула, микропоры, субпелликулярные микротрубочки, полярные кольца, коноид, роптрии и микронемы (Levine, 1970; Крылов, Добровольский, 1980). Некоторые структуры могут отсутствовать. Похожи у споровиков и спиромонасов строение пелликулы и микропор. Следует отметить также наличие у двужгутиковых микрогамет *Sarcocystis* (Vetterling e. a., 1973) ленты, состоящей из четырех микротрубочек, как у *S. angusta*. Причем эта лента у обоих организмов располагается между кинетосомами. Как видно, все виды спиро-монаса без сомнения должны быть отнесены к споровикам.

Наличие общих черт строения спиромонасов и споровиков вряд ли можно объяснить конвергенцией — слишком уж различны их экологические ниши: одни облигатные паразиты, другие хищники. Очевидно, морфологическое сходство этих групп простейших обусловлено общностью происхождения, как считают Крылов и Добровольский (1980).

Таким образом, все три вида в роде *Spiromonas* имеют в плане строения как общие черты, так и некоторые различия. Можно предположить, что имеющиеся различия в плане строения заставят в дальнейшем разделить род *Spiromonas* по крайней мере на два разных таксона, но это дело будущего. В настоящее же время можно с уверенностью считать, что все три вида спиромонасов имеют общий план строения со споровиками и на этом основании должны быть помещены в тип Sporozoa. В пределах типа Sporozoa спиромонасы имеют большее сходство (наличие жгутиков у вегетативных стадий) с представителями класса Perkinsemorpha, существенно отличаясь от последних образом жизни: первые — хищники, вторые — паразиты. До сих пор в типе Sporozoa не были найдены организмы, ведущие хищнический образ жизни, все споровики без исключения относились к паразитам. Эти обстоятельства заставляют выделить спиромонасов в отдельный крупный таксон ранга подкласса в классе Perkinsemorpha.

## Тип **SPOROZOA** Leuckart, 1879; emend. Krylov, Mylnikov

Все виды либо хищники, либо паразиты. Имеют общий план строения: пелликулу, состоящую у расселительных стадий из плазматической мембраны и внутреннего мембранного комплекса, микропору(ы), субпелликулярные микро-трубочки, полярные кольца, коноид (у части редуцирован), роптрии и микронемы (у части редуцированы).

## Класс **PERKINSEMORPHA** Levine, 1978; emend. Krylov, Mylnikov

Свободноживущие хищники или паразиты, имеющие в жизненном цикле вегетативные двужгутиковые стадии развития.

Подкласс SPIROMONADOMORPHINA subcl. n.

Свободноживущие хищники. Вегетативные стадии развития имеют два жгутика.

Отряд SPIROMONADIDA ordo n.

Характеристика подкласса.

Подкласс PERKINSEMORPHINA Levine, 1978; emend.

Krylov, Mylnikov

Все виды паразиты. Зооспоры (спорозоиты?) имеют два жгутика.

Л и т е р а т у р а

- Крылов М. В., Добровольский А. А. Макросистема и филогения споривков. — В кн.: Принципы построения макросистемы одноклеточных животных; (Тр. Зоол. ин-та АН СССР), Л., изд. ЗИН АН СССР, 1980, т. 94, с. 62—74.
- Мыльников А. П. Питание хищных зоофлагеллят. Биология внутренних вод. — Информ. бюл., 1983, т. 60, с. 33—37.
- Жуков Б. Ф., Мыльников А. П. Фауна зоофлагеллят очистных сооружений. — В кн.: Простейшие активного ила. Л., Наука, 1983, с. 27—42.
- Alexeieff A. Matériaux pour servir à l'étude des protistes coprozoites. — Arch. zool. exp. et gen., 1929, t. 68, p. 609—698.
- Brugerolle G., Mignot J. P. Observation sur le cycle l'ultrastructure et la position systématique de *Spiromonas perforans* (Bodo perforans Hollande 1938), flagellé parasite de *Chilomonas paramecium*: ses relations avec les dinoflagellés et sporozoaires. — Protistologica, 1979, t. 15, p. 183—196.
- Foissner W., Foissner I. First record of an ectoparasitic flagellate on ciliates: an ultrastructural investigation of the morphology and the mode of attachment of *Spiromonas gonderi* nov. spec. (Zoomastigophora, Spiromonadidae) invading the pellicle of Ciliates of the genus Colpoda (Ciliophora, Colpodidae). — Protistologica, 1984, t. 20, p. 635—648.
- Hollande A. Ordre des Bodonides. — In: Traite de Zoologie, 1952, t. 1, f. 1, p. 669—693.
- Levine N. D. Taxonomy of the Sporozoa. — J. Parasitol., 1970, vol. 56, p. 208—209.
- Levine N. D. Perkinsus gen. n. and other new taxa in the Protozoan phylum Apicomplexa. — J. Parasitol., 1978, vol. 64, p. 549.
- MacDonald C. M., Darbyshire J. F. The morphology of a soil flagellate, *Spiromonas angusta* (Duj.) Alexeieff (Mastigophorea: Protozoa). — Protistologica, 1977, t. 13, p. 441—450.
- Perkins F. O. Zoospores of the oyster pathogen, *Dermocystidium marinum*. I. Fine structure of the conoid and other sporozoan-like organelles. — J. Parasitol., 1976, vol. 62, p. 959—974.
- Vetterling J. M., Pacheco N. D., Fayer R. Fine structure of gametogony and oocyst formation in *Sarcocystis* sp. in cell culture. — J. Protozool., 1973, vol. 20, p. 613—624.

ЗИН АН СССР, Ленинград;  
Институт биологии внутренних вод  
АН СССР, г. Борок

Поступила 24 I 1986

NEW TAXONS IN THE TYPE SPOROZOA SPIROMONADOMORPHINA SUBCL. N.,  
SPIROMONADIDA ORDO N.

M. V. Krylov, A. P. Mylnikov

S U M M A R Y

Ultrastructure of colourless predatory *Spiromonas angusta* was studied. Pellicle of the cell consists of the external membrane and two membranes of endoplasmic reticulum. Some micropores represent invaginations of plasmalemma. Vegetative stages have two flagella: one flagellum begins from a small flagellated chamber, the other begins directly from the body surface. Subpellicular system of microtubes deviates from the anterior end of the body. Conoid consists of 24—25 microtubes. Two bands of 4 microtubes pass near kinetosomes. Two bundles of narrow micronemae lie in the anterior part of the body, roptries are not found. Large digestive vacuole lies in the hind end of the body. Reproduction of cells carries out in cysts surrounded by a thin membrane. The pattern of the structure of *S. angusta* corresponds fully to that of Sporozoa. On the basis of original and literary data members of the family Spiromonadidae Hollande, 1952 are separated into the subclass Spiromonadomorphina subcl. n. with the order Spiromonadida ordo n. in the class Perkinsemorpha Levine, 1978, the type Sporozoa.

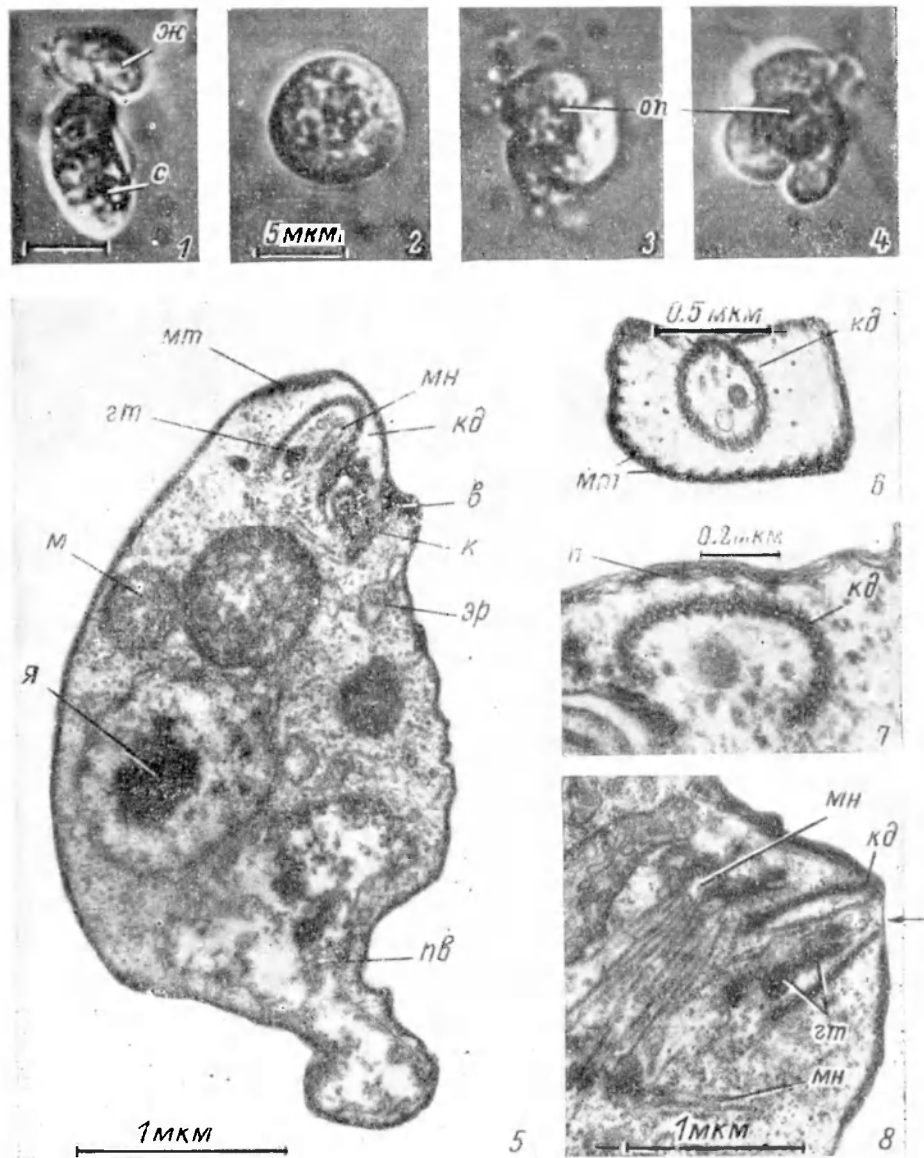


Рис. 3.

1 — нападение спироносы (с) на жертву (ж); 2 — циста; 3, 4 — деление цисты на три особи, на 4 заметны жгутики дочерних особей и остатки пищи (оп); 5 — продольный срез тела хилоника: к — кинетосома, мт — микротрубочки пелликулы, эр — эндоплазматический ретикулум; 6 — микротрубочки коноида (кд) смыкаются в кольцо на переднем конце тела, заметны микротрубочки пелликулы (мт); 7 — микротрубочки коноида (кд) образуют дугу, пелликула (п) состоит из трех мембран; 8 — на переднем конце тела заметны три пучка микронем (мт), в коноиде (кд) видны грушевидные тела (гт), пелликула (п) на кончике переднего конца тела состоит из одной мембраны (стрелка).  
Остальные обозначения такие же, как на рис. 2.



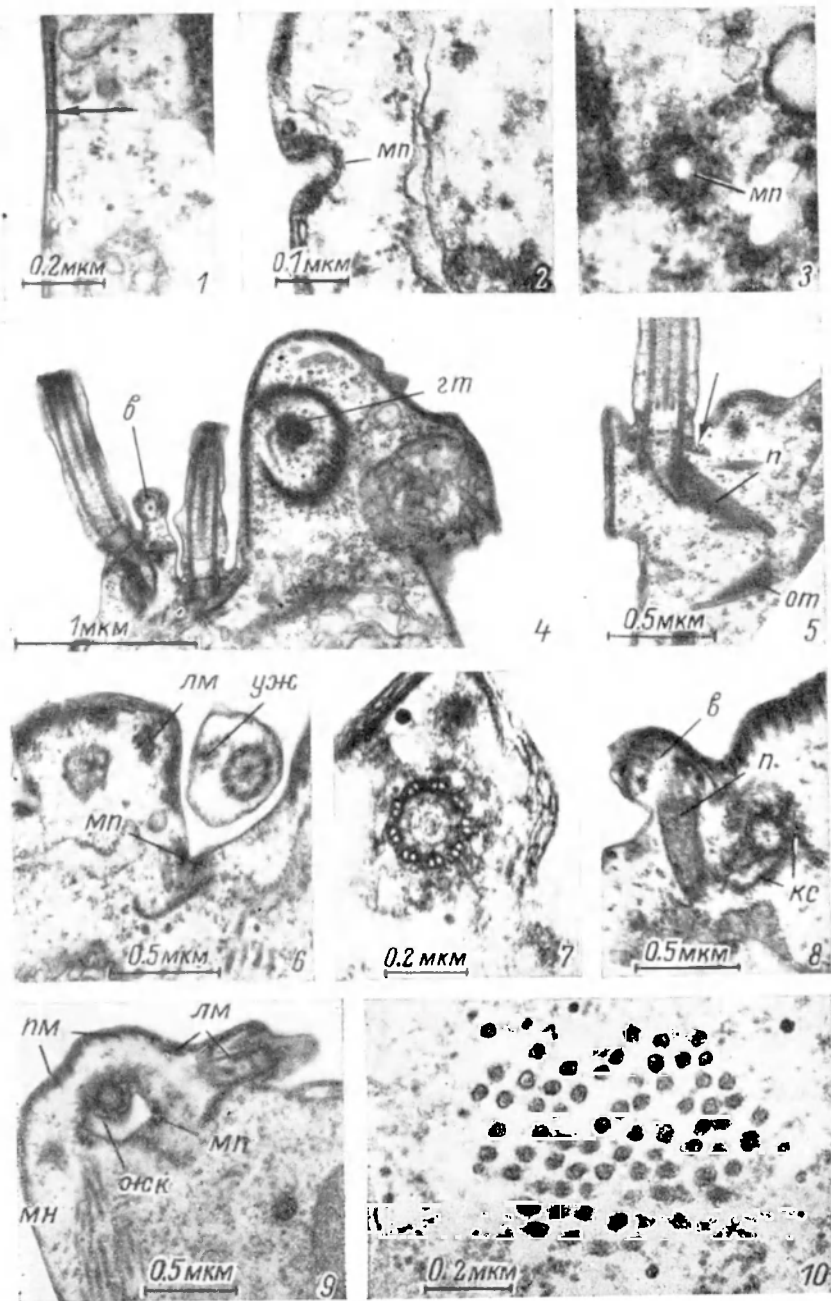


Рис. 4.

1 — мембраны эндоплазматического ретикулома образуют уплотненную пластинку (стрелка); 2, 3 — строение микропоры (мл) на продольном и поперечном срезах; 4 — между жгутиками располагается валик (v), внутри коноида заметно грушевидное тело (gt); 5 — от кинетосом отходит пластинка (п), рядом проходит лента из четырех микротрубочек (стрелка), ниже осмиофильное тело (от); 6 — передний жгутик имеет утолщение (уж) в проксимальной части, в жгутиковом кармане заметна микропора (мп) и лента микротрубочек (лм); 7 — строение переходной зоны жгутика; 8 — от кинетосомы отходят корешковые структуры (кс), вблизи проходит пластинка (п), которая упирается в валик (v); 9 — на среде переднего конца тела заметны жгутиковый карман (жк), две ленты микротрубочек (лм), пелликулярные микротрубочки (п.м), кинетосомы, микропора (мп), микронемы (ми); 10 — поперечный срез пучка микронем.